

平成21年6月4日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790529

研究課題名（和文） 心不全におけるCa²⁺ハンドリング機構解明と是正治療の開発研究課題名（英文） Novel mechanism of abnormal intracellular Ca²⁺ handling in heart failure

研究代表者

片野坂 友紀（KATANOSAKA YUKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60432639

研究成果の概要：

心不全は、心臓のポンプ機能が低下し、全身に十分な血液を送りだせなくなる状態である。最近の研究から、心不全の発症と進展には、心筋細胞内Ca²⁺調節破綻が大きく関わっていることが知られてきたが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究の目的は、心不全発症に大きく関わるCa²⁺輸送体を同定し、この病態生理的意義を明らかにすることを通して、新規治療法開発の分子的基盤を得ることである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全・Ca²⁺輸送体・トランスポーター・チャネル・Ca²⁺ハンドリング

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は、生後速やかに分裂能を失い、その後の成長は生理的肥大により行われる。各種心筋症・高血圧性心疾患・先天性心疾患などの病態では、心筋細胞に過剰に負荷がかかり、生理的肥大の範囲を超えて病的肥大を生じることとなる。心肥大は心不全

の前段階であり、またさらに虚血性心疾患・不整脈・突然死などを発症させる危険因子でもあることから、肥大を予防・抑制することは、不全発症を減少させることに繋がる。最近の研究から、肥大型リモデリングは、Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素・カルシニューリンの活性化による肥大応答遺伝子群

の発現により引き起こされることが明らかとなってきた(Molkentin JD, 1998, Cell)。カルシニューリン活性は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存するため、心肥大・不全発症における Ca^{2+} ハンドリングの分子機構を明らかにすることは大変意義深いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、心不全心筋細胞内の Ca^{2+} ハンドリング異常を是正するために、 Ca^{2+} 輸送体そのものの機能制御異常の分子機序を、不全形成様式・進行過程に応じて、詳細に分子レベルで解明することを通して、より効果的な新規治療ターゲット分子を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

心肥大や心不全病態で見られる心筋細胞内での Ca^{2+} ハンドリング破綻は、 Ca^{2+} 流入系の異常のみならず、 Ca^{2+} 汲み出し系や筋小胞体機能が低下することも原因となる。このうち、筋小胞体 Ca^{2+} チャネル・リアノジン受容体においては、心筋細胞内の Ca^{2+} ハンドリングにおける寄与が大きいことから治療効果が期待できる。最近の研究から、ウサギの不全心筋より単離した心筋細胞では、小胞体機能が低下してしまうために $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体による細胞外への Ca^{2+} 汲み出し効果が、細胞の全 Ca^{2+} 排出能力のうち 50%を占めるようになることが報告されている (Bers DM, 2006, J. Pharmacol. Sci.)。このことは、心不全への多様な進行様式によっては、小胞体機能の改善のみでなく筋細胞膜を介する Ca^{2+} 流入および Ca^{2+} 汲み出し系の異常もまた筋変性疾患の病態発症に重要であることを示している。また、心不全進行の発症機序は、心臓への機械受容負荷様式や形質膜脆弱度に応じて多様であるため、心筋細胞の機械感受性を決定す

る Ca^{2+} 流入系・機械受容チャネルの制御異常も無視できない。本研究では、心筋細胞形質膜に存在する Ca^{2+} 輸送体の機能解析を通して、病態生理的意義を検討する。具体的な方法は以下に示す。

(1) 様々な負荷により誘導される心不全モデル動物の作製

胸部大動脈結紮による心不全モデル、モノクローリン投与による右室肥大型モデル、イソプロテレノール投与による肥大・不全モデル、高血圧自然発症ラットによる不全モデルを作製する。また、遺伝子改変モデルの使用を考慮して、小型なマウスで同様のモデル作製をおこなった。

(2) 心不全発症に関わる Ca^{2+} 輸送体の同定

心臓に発現する各種 Ca^{2+} 輸送体に関して、PCR法、免役組織科学的方法、ウェスタンブロットティング法等を利用して、正常動物の心臓と、(1)で作製したモデル動物から得られる心臓における発現量や分子局在を比較する。

(3) 心不全発症に関わる Ca^{2+} 輸送体の機能解析

(2)で得られた結果に基づいて、心不全発症に大きく関わると考えられる Ca^{2+} 輸送体を同定し、その分子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 様々な負荷により誘導される心不全モデル動物の作製と病態評価

ラットおよびマウスを用いて、心肥大・心不全病態モデル動物を作製した。病態の評価は、心臓形態、心体重比、心エコー診断、肥大マーカーの発現 (ANPの発現、カルシニューリン活性等) にておこなった。この結果、肥大・不全の誘導方法によって、細胞応答の分子メカニズムや病態に大きく関わることが知られる分子の修飾状況に違いがあることが明らかになった。

(2) 心不全発症に関わるCa²⁺輸送体の同定

既存の筋形質膜に局在するCa²⁺輸送体に対する抗体を用いて、正常心と病態における発現量や局在の変化を比較したところ、ある種のCa²⁺輸送体について、病態において発現上昇しているもの、分子修飾状況が異なるものが明らかとなった。

また、これまで心筋細胞での発現報告がなく、生理的な役割が不明であったCa²⁺輸送体について、ある種の肥大・不全モデルでの発現上昇が認められた。

(3) 心不全発症に関わるCa²⁺輸送体の機能解析

(2)で心不全発症に関わることが予想されるCa²⁺輸送体について、Ca²⁺イメージング法、電気生理学的方法により機能解析を行った。その結果、細胞内Ca²⁺濃度に依存して活性変化を受けやすいことが明らかとなった。このことから、病態において細胞内Ca²⁺濃度が上昇した際には、Ca²⁺輸送体活性に影響を与えて、細胞内Ca²⁺ハンドリングを悪化させる可能性を示している。

以上の結果から、心不全発症に大きく関わるCa²⁺輸送体としてターゲット分子をいくつか同定することができた。今後は、これまで得られた知見を基に、ターゲット分子の病態生理的意義を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

すべて査読有り

(1) Yuki Katanosaka, Jin-Hua Bao, Tomoyo Komatsu, Tomohiko Suemori, Akira Yamada, Satoshi Mohri, Keiji Naruse. Analysis of cyclic-stretching responses using cell-adhesion-patterned cells. J. Biotechnology 2008, 133: 82-89

(2) Yuko Iwata, Yuki Katanosaka, Takashi Hisamitsu, Shigeo Wakabayashi.

Enhanced Na⁺/H⁺ exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. American Journal of Pathology 2007, 171: 1576-87

(3) Yuki Katanosaka, Shigeo Wakabayashi, Munekazu Shigekawa. Phosphorylation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in TAB-induced cardiac hypertrophy. Ann. NY. Acad. Sci. 2007, 1099, 373-376

(4) Munekazu Shigekawa, Yuki Katanosaka, Shigeo Wakabayashi. Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange by calcineurin and protein kinase C. Ann. NY. Acad. Sci. 2007, 1099, 53-63

(5) Uetani Tadayuki, Yamashita Daisuke, Shimizu Juichiro, Misawa Hiromi, Tatematsu Yasushi, Hamaguchi Yukihisa, Kato Toshiaki, Katanosaka Yuki, Miyasaka Takehiro, Matsubara Tatsuaki, Furukawa Koichi, Murohara Toyooki, Takaki Miyako, Nakayama Shinsuke. Heart Slice NMR. AJP-Heart and Circulatory Physiology, 2007, 292, H1181-1186

〔学会発表〕(計8件)

(1) Yuki Katanosaka, Keiji Naruse. Stretch-induced Up-regulation of Caveolae Formation and SOC Activities in HUVEC., The 53th annual meeting of biophysical society. March 2, 2009, (Boston)

(2) Yuki Katanosaka, Keiji Naruse. Stretch-induced Up-regulation of SOC Activities in HUVEC., The 49th annual meeting of cell biology. December 16, 2008, (San francisco)

(3) 竹内崇、片野坂友紀、岩崎慶一朗、山田章、毛利聡、成瀬恵治、心臓に発現する新規

Ca²⁺トランスポーターの単離, 中国四国生理学会, 11月15日, 2008年, (愛媛)

(4) 片野坂友紀, 成瀬恵治, ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるTRPV2 ノックダウンの効果

第85回日本生理学会, 3月26日, 2008年(東京)

(5) 片野坂友紀, 成瀬恵治, ヒト臍帯内皮細胞におけるTRPV2 ノックダウンによる伸展刺激依存的応答の抑制効果, 第45回日本生物物理学会, 12月22日, 2007年(横浜)

(6) Yuki Katanosaka, Keiji Naruse. TRPV2 knockdown suppresses the stretch-induced Ca²⁺ increase in HUVEC, The 48th annual meeting of cell biology. December 6, 2007, (San diego)

(7) Yuki Katanosaka, Mechanosensitive channels in cardiovascular system; Cardiac Electro-Mechanical Function: Cell-Organ Cross-Talk Revealed via Integration of Experiments and Models, Biotechnology and Biological Sciences Research Council, September 1, 2007 (Oxford)

(8) Yuki Katanosaka, Keiji Naruse. TRPV2 knockdown suppresses the stretch-induced Ca²⁺ increase and subsequent cellular responses in HUVEC, The 52th annual meeting of biophysical society. February 6, 2007, (Long beach)

[図書] (計4件)

(1) 片野坂友紀, 竹内崇, 貝原恵子, 成瀬恵治: 「伸展培養法」培養細胞実験ハンドブック 247-251, 2008

(2) 片野坂友紀, 竹内崇, 成瀬恵治: 「メカニカルストレスに対する細胞応答の解析技術」次世代医療のための高分子材料工学, 2008年9月: 158-167

(3) 片野坂友紀: 心不全発症におけるNa⁺/Ca²⁺

交換体(NCX1)の役割.

心臓 39(11):954-959, 2007

(2007. 11. 15 発行, 日本心臓財団)

(4) 片野坂友紀, 成瀬恵治: ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)のストレッチ刺激に対する細胞応答. 医学のあゆみ 223(6):469-473, 2007 (2007. 11. 10 発行, 医歯薬出版株式会社)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60432639

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

成瀬 恵治 (Naruse Keiji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40252233

毛利 聡 (Mohri Satoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 00294413

竹内 崇 (Takeuchi Takashi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

岩崎 慶一郎 (Iwasaki Keiichiro)

岡山大学・医学部・学生